



TITLE:

# 肝臓HMG-CoA還元酵素活性とコレステロール胆石の形成および溶解との相関に関する実験的研究

AUTHOR(S):

鎌田, 壽夫

---

CITATION:

鎌田, 壽夫. 肝臓HMG-CoA還元酵素活性とコレステロール胆石の形成および溶解との相関に関する実験的研究. 日本外科宝函 1980, 49(4): 477-495

ISSUE DATE:

1980-07-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208452>

RIGHT:

## 肝臓 HMG-CoA 還元酵素活性とコレステロール 胆石の形成および溶解との相関に関する実験的研究

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

鎌 田 壽 夫

〔原稿受付：昭和55年3月10日〕

### Experimental Study on Hepatic HMG-CoA Reductase Activity in Relation to the Formation and Dissolution of Cholesterol Gallstones

TOSHIO KAMATA

Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

In order to elucidate mechanisms of the formation and dissolution of cholesterol gallstones, the activity of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase), the rate limiting enzyme in hepatic biosynthesis of cholesterol, was measured in hamsters fed with various diets.

1) Cholesterol gallstones were formed in about 80% of hamsters fed with glucose *plus* ethylpalmitate (GP) diet which is deficient in essential fatty acids, whereas gallstones were not formed in hamsters fed with glucose *plus* ethyllinoleate (GL) diet, starch *plus* ethylpalmitate (SP) diet or chow diet.

2) Hepatic HMG-CoA reductase activity in hamsters fed with GP diet increased 6 times of those fed with GL diet and twice of those fed with SP diet.

3) Biles of hamsters became supersaturated with cholesterol due to increased hepatic cholesterol secretion 14 days after feeding with GP diet, while hepatic HMG-CoA reductase activity increased more rapidly and reached the maximum level as early as 7 days after feeding.

These findings indicate that there is a close correlation between increased hepatic HMG-CoA reductase activity and the formation of cholesterol gallstones.

---

Key words : Dietary factor, Formation of gallstones, Dissolution of gallstones, HMG-CoA reductase, Biliary lipids.

索引語：食餌因子，胆石形成，胆石溶解，HMG-CoA 還元酵素，胆汁脂質。

Present address : Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

4) When hamsters were fed with GP diet for 28 days and then the diet was changed to GL or chow diet, incidence of cholesterol gallstones diminished to about 30% after 28 days of feeding of the latter diets and to 0% after 56 days. Continued feeding with GP diet showed no effect on incidence of cholesterol gallstones. Hepatic HMG-CoA reductase activity was reduced by the diet change, but it was not reduced by continued feeding with GP diet.

It is concluded that a diet which is rich in glucose and deficient in essential fatty acids increases hepatic HMG-CoA reductase activity, leading to the formation of cholesterol gallstones, and that change to a diet of non-lithogenic composition lowers HMG-CoA reductase activity, resulting in the dissolution of cholesterol gallstones once formed.

## 緒 言

本邦における胆石症の研究は、19世紀末に世界をふうびした Naunyn の炎症説に基づいており、その成因は局所炎症にあるとする学説が長く支配的であった。しかし、本学内科の故松尾教授一門らは、1928年以來「胆石症は全身の代謝疾患である」との見地から、コレステロール代謝の面まで研究を広げたが、分析技術の未発達もあって十分にはその代謝を解明することはできなかった。

ところで本邦におけるコレステロール胆石症患者の発生は欧米に比べて少ないものとされてきたが、第2次世界大戦後、本邦人の食餌内容が変化し、動物性脂質や砂糖の摂取量増加、繊維類の摂取量減少などの特徴を示す欧米化食餌内容に近づくにともない、本邦においても剖検例はもちろん、臨床的にもコレステロール胆石症患者の発生が急増してきている<sup>36,52)</sup>。

これら食餌因子が、胆石とりわけコレステロール胆石の形成にどのようなかわりを有しているかを、究明することは、胆石の予防ひいては、その治療にも直接関係する重要な事項であるといえる。

元来、コレステロールは水に不溶の物質であるのに、正常の胆汁中では十分溶存されているわけである。胆汁中でのコレステロールの溶存機構については、1954年 Isaksson<sup>27)</sup> がコレステロール、胆汁酸、レシチンの三者の胆汁脂質の構成比が、その溶存を決定することを提唱して以来、胆汁脂質分析法の進歩と共に最近急速に明らかになってきた。現在では、この溶存機構はコレステロール、胆汁酸、リン脂質の三者により構

成される混合ミセルにあることがわかり<sup>1,5)</sup>、しかも、このミセルのコレステロール溶存能には限界があり、胆汁脂質構成比がミセル域外に逸脱した時には、いつでもコレステロールが胆汁中で析出しうることにも明らかになった<sup>1,24)</sup>。一方、こうしたコレステロール胆石の母体であるコレステロール過飽和な胆汁、すなわち胆石易形成胆汁：lithogenic bile の産生部位が肝臓であることも広く知られるようになってきており<sup>48,55)</sup>、コレステロール胆石の成因を検討することは、すなわち lithogenic bile の成因を検討することにあると言っても過言ではない。

一方、日笠ら<sup>21,34,35)</sup>はヒトの胆石症の成因を研究する中で、コレステロール胆石の形成には食餌因子が最も重要な役割を演じていることを見出した。特に、胆石形成食餌投与によりコレステロール胆石を形成するハムスターの肝臓における酢酸からコレステロールへの生合成能が亢進していること。また、その条件においてメバロン酸からコレステロールへの生合成能には変化が認められなかったことを見出し、コレステロール胆石形成時の lithogenic bile の形成機序に新しい基礎的な知見を得た。

この事実は、コレステロール胆石を形成するハムスターの肝臓におけるコレステロール生合成能の亢進が、コレステロール生合成を律速する酵素として最近注目されている、肝臓 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA還元酵素 (以下 HMG-CoA reductase)<sup>13,40,46)</sup> を介していることを示唆するものである。事実ヒト胆石症患者の HMG-CoA reductase 活性が亢進していることも報告されており<sup>39,45)</sup>、また、コレステロール胆

石溶解剤として臨床応用され始めたケノデオキシコール酸<sup>11)</sup>は、HMG-CoA reductase 活性を低下させるとの報告<sup>6)</sup>も併せ考えると、本酵素がコレステロール胆石の形成及び溶解機序において重要な役割を持っているものと推測される。

そこで著者は、種々の食餌条件下で、特に食餌中の糖質と脂質との関連において飼育したハムスターの HMG-CoA reductase 活性を測定し、本酵素活性とコレステロール胆石形成との関係について検討した。また、その結果をもとにして、投与する食餌組成を変えることにより純食餌性にコレステロール胆石の溶解にも成功し、その際 HMG-CoA reductase 活性の果たす役割についても検討を加えたので報告する。

## 方 法

### (1) 試 薬

D, L-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A [<sup>14</sup>C-3], 50.2 mCi/mmol, および D, L-[<sup>3</sup>H-5]mevalonic acid (DBED 塩) は New England Nuclear Co. より、NADP, G-6-P (2 ナトリウム塩), G-6-P dehydrogenase (type XII) は Sigma Chemical Co. より、パルミチン酸エチル, リノール酸エチル, デイチオソレイトール, メバロン酸は半井化学より、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルシートは E, Merck. Darmstadt より、Stergnost-3α は Nyegaard & Co. より、TC Kit-K および PL Kit-K は日本商事より購入した。その他の試薬及び飼育用合成食には特級試薬を用い、有機溶媒としては分析用試薬を用いた。

### (2) 試 獣

離乳直後の雄のゴールデンハムスター (以下ハムスター) を著者らの実験室で飼育し環境に順応させ、体重 40~60g になったものを試獣として用いた。実験室は、温度26°C、湿度60%に維持し、午後2時から深夜2時まで点灯し、深夜2時から午後2時までは消灯するという照明スケジュールを施行した。ハムスターは鋼製のケージに個別に入れ、水と食餌は ad libitum に摂取させた。飼育用合成食は摂取量の多寡にかかわらず、週3度新たに調製したものに切り換えた。全身状態の観察を行ないつつ、週一回体重を測定した。

### (3) 実験食組成

実験に用いた合成食餌の組成を Table 1 に示す。コレステロール胆石形成食餌として、ブドウ糖・パルミチン酸食餌 (GP 食餌) を作製し、GP 食餌に含まれる非不可欠脂肪酸であるパルミチン酸を不可欠脂肪

Table 1 Percent composition of experimental diet

Diet <sup>a</sup>	GP	GL	SP	SL
Glucose	65.0	65.0		
Potato starch			65.0	65.0
Ethylpalmitate	5.0		5.0	
Ethyllinoleate		5.0		5.0

a. All experimental diets contained 20% casein, 5% salt mixture, 3.5% carboxymethyl-cellulose, 1.0% vitamin mixture and 0.5% choline chloride. The salt mixture contained 4.62% NaCl, 7.10% MgSO<sub>4</sub>, 9.23% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 25.44% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14.40% CaH<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 3.15% Fe citrate, 34.67% Ca lactate and 1.39% KI. One gm of the vitamin mixture contained 2,500 I. U. of vitamin A, 1.0mg of thiamine, 1.5mg of riboflavin, 1.0 mg of pyridoxine, 0.5 mg of folic acid, 1.0 μg of vitamin B<sub>12</sub>, 37.5mg of ascorbic acid, 200 I. U. of vitamin D, 1.0mg of tocopherol, 10.0mg of niacin, 5.0mg of pantothenic acid and 10.0mg of inositol.

酸であるリノール酸に置き換えたブドウ糖・リノール酸食餌 (GL 食餌), 同じくブドウ糖を澱粉に置き換えた澱粉・パルミチン酸食餌 (SP 食餌), 両者を置き換えた澱粉・リノール酸食餌 (SL 食餌) を作製した。

一般飼育用固型食餌 (以下固型食餌) は、船橋農場製のもの (飼育用、千葉) を用いた。

### (4) コレステロール胆石形成率

コレステロール胆石は、スライトガラス上に、ハムスターの胆のう内容物を塗布した上、肉眼的に認められるものを有石例とした。

### (5) 肝ミクロゾームの調製

ハムスターの屠殺は、午前8時から10時までの間 (消灯後6~8時間後) に断頭により行なった。胆のうを除去した後、肝臓をすみやかに冷食塩水に入れ、8倍量の10mM EDTA, 10mMメルカプトエタノール, 250mM 蔗糖を含む 100mM リン酸バッファー、pH 7.4 で、Potter のホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。ホモゲネートを 18,000g で15分間遠沈し、上清を再び同じ条件で遠沈し得られた上清を、100,000g で1時間超遠心した。超遠心後、得られたミクロゾームベレットを先に用いたバッファーで懸濁し、HMG-CoA reductase 活性測定の酵素源とした。以上の操作は全て 4°C 以下の条件下に行なった。ミクロゾームベレットを -20°C で保存する限り、3週間は酵素活

性の失活は認められないことを確認した。

#### (6) HMG-CoA reductase 活性の測定

Goldfarb<sup>18)</sup> らの double label assay を一部変更して酵素活性を測定した。反応系は、リン酸バッファー、pH7.4, 100 $\mu$ mol; D, L-[3-<sup>14</sup>C]HMG-CoA, 0.15  $\mu$ mol (specific activity=881 $\pm$ 63cpm/nmol); NADP, 1 $\mu$ mol; G-6-P, 3  $\mu$ mol; G-6-P dehydrogenase, 1 I. U.; EDTA, 10 $\mu$ mol; ディチオソレイトール, 10  $\mu$ mol と 0.3-0.8mg のミクロゾーム蛋白を含む計 1ml で、37°C で 1 時間インキュベートした。10N NaOH 0.1ml で反応を停止し 30 分後キャリアーとしてメバロン酸を 20 $\mu$ mol、回収率補正のため <sup>3</sup>H-メバロン酸を正確に、(通常 50,000 cpm) 加えた。濃塩酸 0.2ml を加えて酸性にし充分ラクトン化させた後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を約 1g 加え、エーテル 5ml を用いて 5 回抽出した。エーテルを窒素ガスで蒸発させた後、アセトン 200 $\mu$ l に溶解し、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルシートにのせ、アセトン:ベンゼン (1:1) で 1 時間展開した。クロマトグラフィー展開後、 $\beta$ -カメラでメバロン酸の存在する部位 (Rf 0.5-0.7) を確認し、その部位を切り取り Bray 氏液<sup>4)</sup> と共にバイアルに入れ、Isocap-300 (Nuclear Chicago) で計測した。酵素活性測定は全て duplicate で行なった。酵素蛋白量は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法<sup>32)</sup> で測定した。

#### (7) 胆汁脂質の測定

午前 8 時から 12 時までの間に、ハムスターをネブタール麻酔下に開腹し、胆のう管を結紮した後、総胆管に直径 0.2-0.5mm のポリエチレンチューブを挿入し、挿入後 1 時間に得られた肝胆汁量を測定し、その胆汁脂質濃度を測定した。総胆汁酸量は Stergnost-3a<sup>16)</sup>、総コレステロール量は TC Kit-K<sup>2)</sup>、リン脂質は PL Kit-K<sup>23)</sup> を用いて測定した。胆汁のコレステロール飽和度を示す lithogenic index は Metzger の方法<sup>33)</sup> を用いて算出した。この index を用いれば、index が 1.0 未満の胆汁はコレステロールに飽和されておらず、1.0 以上を示す胆汁はコレステロール飽和ないしは過飽和であることを意味している。

### 実験成績

#### [I] HMG-CoA reductase 活性測定に関する基礎的実験成績

HMG-CoA reductase 活性に影響を与える因子として、コレステロールの投与や絶食といった因子の他に照明スケジュールや、加齢等の因子がこれまでラット

において知られているが<sup>40)</sup>、こうした因子については、ハムスターにおいては未だ説明されていない。本実験の目的が、食餌因子の HMG-CoA reductase 活性に及ぼす影響を介して、コレステロール胆石の形成および溶解をひきおこすことを証明することにあるので、実験に際しては本酵素活性に影響を与える食餌因子以外の因子は、極力除外する必要がある。

そこで、まず予備実験として、Table 1 に示した実験食餌のうちで GP 食餌、GL 食餌、SP 食餌および固型食餌で、ハムスターを 28 日間飼育し、食餌因子以外に本酵素活性に影響を与える因子について検討し、それらの影響の最も少ない実験条件の設定を行った。

#### (1) HMG-CoA reductase 活性測定に至適条件

固型食餌で飼育したハムスターの肝ミクロゾームを用いて、蛋白量と反応時間が酵素反応に及ぼす影響について検討した (Fig. 1, Fig. 2)。直線性は、ミクロゾーム蛋白量 1mg まで、また、反応時間は 1 時間までの間において認められた。

各食餌飼育群より得られた HMG-CoA reductase の基本的性格を調べるために至適 pH と Km 値を測定した。

4 種の食餌飼育群から得られた酵素はいずれも pH 7.4 付近の中性領域に至適 pH を有した (Fig. 3)。また、Lineweaver-Burke プロットから求めた Km 値

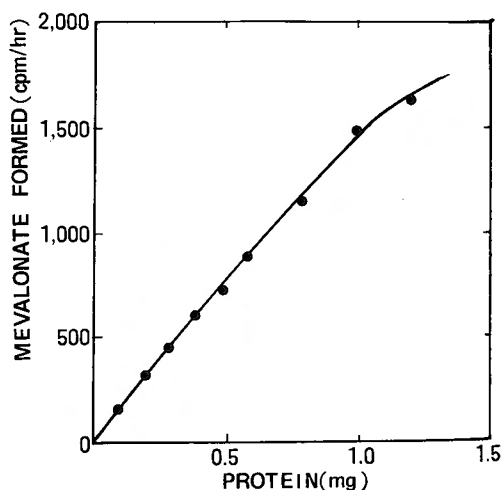


Fig. 1. Effect of increasing amount of microsomes on the rate of reduction of HMG-CoA. Standard conditions except for protein concentration. Liver microsomes were obtained from hamsters fed with chow diet for 28 days.

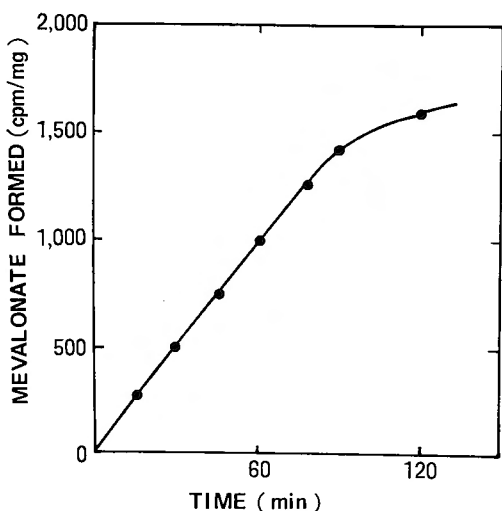


Fig. 2. Time course of enzymatic reduction of HMG-CoA. Standard assay conditions except for incubation time. Liver microsomes were obtained from hamsters fed with chow diet for 28 days.

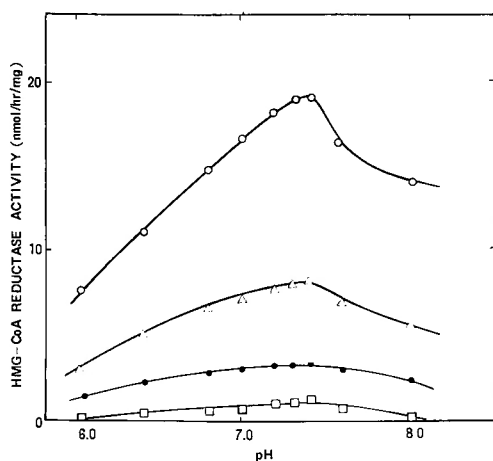


Fig. 3. Effect of pH on HMG-CoA reductase activity. Standard assay conditions except for pH of buffer. Tris buffer was used for pH values above 8.0. The pH value is expressed as mean of initial and final pH values. Liver microsomes were obtained from hamsters fed with experimental diet for 28 days.

- , animals fed with GP diet.
- △—△, animals fed with SP diet.
- , animals fed with GL diet.
- , animals fed with chow diet.

は、GP 食餌飼育群で  $7.63 \times 10^{-5} \text{M}$ , GL 食餌飼育群で  $1.42 \times 10^{-5} \text{M}$ , SP 食餌飼育群で  $7.14 \times 10^{-5} \text{M}$ , および固型食餌飼育群で  $1.22 \times 10^{-5} \text{M}$  であり、不可欠脂肪酸欠乏食餌群である GP および SP 食餌飼育群では、不可欠脂肪酸含有食餌群である GL 食餌あるいは固型食餌飼育群よりも高い  $K_m$  値を示した (Fig. 4).

そこで以下の HMG-CoA reductase 活性測定においては、いずれの食餌飼育群においても基質が過飽和であることの確かめられた基質濃度  $150 \mu\text{M}$  を用いることにした。

### (2) 週令にともなう HMG-CoA reductase 活性の変動

ハムスターの HMG-CoA reductase 活性の発育に伴う変動を検討するために、固型食餌で飼育したハムスターにおいて、本酵素活性と週令との関係を検討したところ、週令が 4—5 週目のハムスターにおける本酵素活性は  $7.5 \pm 4.1 \text{ nmol/hr/mg}$  ( $n=15$ ) であったのに比べ、週令が 8—9 週目のものでは、 $1.0 \pm 0.1 \text{ nmol/hr/mg}$  ( $n=12$ ) であり、週令のすすむにつれて本酵素活性の低下していることが認められた ( $p<0.05$ ).

この様に週令の差は本酵素活性に影響を与えることが判明したので、実験に際しては、離乳直後のハムスターを購入し、週令が 5—6 週になったもののうちで体重が  $50 \pm 10 \text{ g}$  にあるハムスターを用いることにした。

### (3) HMG-CoA reductase 活性の日内変動

最近 Ho<sup>22)</sup> らにより食餌投与時間を決めて飼育したハムスターにおいて、肝臓におけるコレステロール合成能は食餌摂取後に亢進することが報告され、ハムスターにおいても HMG-CoA reductase 活性に日内変動がある可能性があることが示唆された。

そこで、ラット<sup>13,40)</sup>において既に報告されている本酵素活性が最高値と最低値を示す時間帯である真夜中と真昼にハムスターを屠殺し、本酵素活性を測定したところ、たしかに、本実験に用いたハムスターにおいても Table 2 に示した様に固型食餌飼育群においては、真夜中の酵素活性 (朝 8 時屠殺) は、真昼の酵素活性 (夜 8 時屠殺) よりも 1.5 倍高かったが、GP, GL, SP 食餌飼育群では、個体差が大きく、いずれの群においても、真夜中の本酵素活性と真昼の本酵素活性との間には有意の差が認められなかった。

しかし、いずれの合成食餌飼育群における本酵素活性は、真昼においても真夜中においても、固型食餌飼育群の活性よりもはるかに亢進していた。

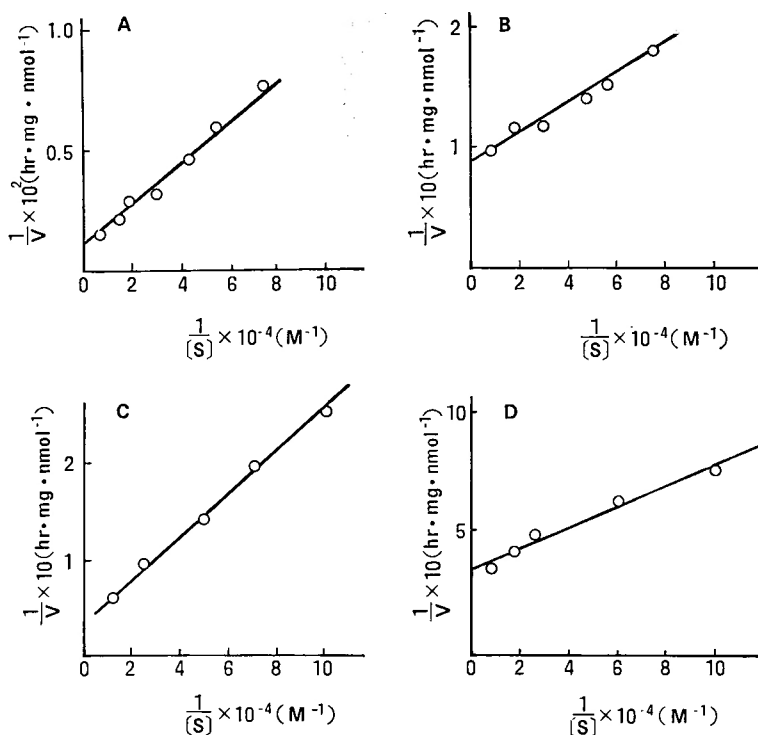


Fig. 4. Lineweaver-Burke plots for HMG-CoA reductase. Km values were  $7.63 \times 10^{-5} \text{M}$  in A (GP diet),  $1.42 \times 10^{-5} \text{M}$  in B (GL diet),  $7.14 \times 10^{-5} \text{M}$  in C (SP diet) and  $1.22 \times 10^{-5} \text{M}$  in D (chow diet)

Table 2 Circadian rhythm of HMG-CoA reductase activity<sup>a</sup>

Diet	HMG-CoA reductase activity	
	8 AM	8 PM
	nmol/hr/mg	
GP	$33.8 \pm 12.2$	$28.9 \pm 18.3$
GL	$5.4 \pm 4.3$	$5.3 \pm 2.6$
SP	$12.1 \pm 9.8$	$10.7 \pm 3.0$
Chow	$1.5 \pm 0.4^b$	$1.0 \pm 0.2$

- a. Animals were fed with experimental diets for 28 days in a room where the lights were automatically regulated to go off at 2AM and on at 2PM daily. Five to six animals in each diet group were killed at 8 AM and 8 PM. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.
- b. Significantly different from the activity at 8 PM ( $p < 0.05$ ).

## ② コレステロール胆石形成と HMG-CoA reductase 活性との相関についての実験成績

コレステロール胆石形成に及ぼす HMG-CoA reductase 活性の影響を検討するために、種々の食餌条件下で飼育したハムスターのコレステロール胆石形成率、胆汁脂質分泌および HMG-CoA reductase 活性を測定した。

### (1) コレステロール胆石形成率

GP 食餌を含む 4 種類の食餌で 28 日間ハムスターを飼育した結果を Table 3 に示す。ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌である GP 食餌で飼育したハムスターでは、高率にコレステロール胆石の形成を認めたが、固型食餌および不可欠脂肪酸である リノール酸を含む GL 食餌で飼育した群においては全くその発生を認めなかった。(Table 3, Exp. 1). 形成されたコレステロール胆石は化学分析によりコレステロールを 90% 以上含む純コレステロール胆石であった。時として GL 食餌飼育群において暗黒色のコックス様胆石の発生を

**Table 3** Incidence of cholesterol gallstones and level of HMG-CoA reductase activity<sup>a</sup>

	Diet	Body Weight (g)	Liver Weight (g)	Incidence of Cholesterol stones	HMG-CoA reductase activity (nmol/hr/mg)
Exp. 1	GP	55±7.5	3.3±0.4	9/11	25.8±3.3 <sup>bc</sup>
	GL	71±7.1	3.7±0.5	0/13	4.1±2.3 <sup>b</sup>
	Chow	102±17.8	4.5±0.9	0/5	1.6±0.5
Exp. 2	GP	60±8.2	3.3±0.5	12/15	30.8±7.5 <sup>bd</sup>
	SP	49±6.8	2.9±0.5	0/21	17.2±1.2 <sup>b</sup>
	Chow	114±3.8	4.4±0.4	0/5	1.6±0.7

a. Animals were fed with experimental diets for 28 days. Data are expressed as mean ± SD.

b. Significantly different from chow diet group ( $p < 0.05$ ).

c. Significantly different from GL diet group ( $p < 0.05$ ).

d. Significantly different from SP diet group ( $p < 0.05$ ).

認めたが、これらは化学分析の結果、コレステロールを含有していないことがわかったので、胆石形成率から除外した。

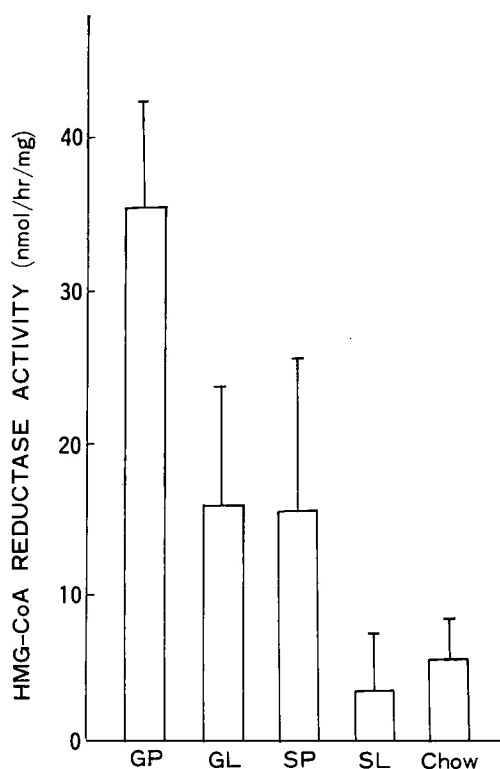
また GP 食餌中のブドウ糖を澱粉に置き換えた SP 食餌で飼育した群においても、コレステロール胆石の発生は認められなかった (Table 3, Exp. 2)。この様に、食餌中の糖質と脂質の種類が、コレステロール胆石の形成に強い影響を与えること、すなわち、ブドウ糖の多量摂取に加え、不可欠脂肪酸の欠乏という2つの食餌因子が重なった際にはコレステロール胆石が形成されるが、不可欠脂肪酸を添加した際、あるいはブドウ糖を澱粉に置き換えた際には、コレステロール胆石の形成が完全に抑制されることが判明した。

## (2) HMG-CoA reductase 活性

a) Table 3 に示す様に、GP 食餌で飼育したハムスターの HMG-CoA reductase 活性は  $25.8 \pm 3.3$  nmol/hr/mg (Table 3, Exp. 1) あるいは  $30.8 \pm 7.5$  nmol/hr/mg (Table 3, Exp. 2) であったのに比べ、固型食餌、GL 食餌および SP 食餌で飼育した群における本酵素活性は、それぞれ  $1.6 \pm 0.5$ ,  $4.1 \pm 2.3$ ,  $17.2 \pm 1.2$  nmol/hr/mg であり、コレステロール胆石形成の認められる GP 食餌飼育群における HMG-CoA reductase 活性は、コレステロール胆石形成の認められない他の3種の食餌飼育群に比べて著しく亢進していた。

b) Table 3 の結果から各食餌飼育群の間には、明瞭な HMG-CoA reductase 活性の差異が認められ、それは食餌因子の影響によるものと考えられた。

しかし、固型食餌で飼育したラットにおいて、本酵素活性は食餌摂取量に応じて亢進することが知られて



**Fig. 5.** Effect of diets on HMG-CoA reductase activity. Animals were fed with experimental diets for 7 days. Bar represents mean with SD from six animals.



Table 4 Incidence of cholesterol gallstones, and secretion rate and composition of biliary lipids\*

Duration day	Diet	Incidence of Cholesterol stones	Bile flow μl/hr	Secretion rate		
				Cholesterol nmol/hr	Bile acids μmol/hr	Phospholipids nmol/hr
7	GP	0/19	220±54 (6)	132±98	6.26±2.10	177±122
	GL	0/15	225±49 (5)	113±16	6.44±1.44	356±81
14	GP	11/19	253±29 (4)	408±123 <sup>bc</sup>	5.76±0.78	254±96
	GL	0/15	221±33 (4)	221±33 <sup>b</sup>	7.78±2.03	438±258
21	GP	9/14	243±40 (4)	493±104 <sup>bc</sup>	6.05±0.98	470±273
	GL	0/10	233±26 (4)	135±10	7.93±1.99	407±256
28	GP	10/13	249±14 (4)	572±339 <sup>bc</sup>	7.16±0.67	636±349
	GL	0/10	227±40 (5)	227±40	8.43±2.81	413±260
	Chow	0/13	264±57 (7)	113±25	9.73±1.33	360±193

a. Bile was collected for one hour after cannulation of common duct. Data are expressed as mean ± SD. Number of animals examined are shown in parenthesis.

b. Significantly different from chow diet group ( $p<0.05$ ).

c. Significantly different from GL diet group at the same duration of feeding ( $p<0.05$ ).

いるので<sup>40)</sup>、各食餌飼育群間における本酵素活性の差異が食餌因子によるものであると断定するためには各食餌飼育群間における食餌摂取量を測定する必要がある、また、固型食餌と合成食餌との間に存在する糖質と脂質以外の食餌因子が本酵素活性に与える影響を検討する必要もあった。

そこで、GP食餌、GL食餌、SP食餌および固型食餌の他に、最も固型食餌に近い組成を持つ澱粉・リノール酸食餌であるSL食餌を新たに加えて、ハムスターを短期間(7日間)飼育し、期間中の食餌摂取量を測定するとともに、7日後にハムスターを屠殺して本酵素活性の測定を行なった。

その結果、各食餌飼育群間には食餌摂取量の有意の差はなかったにもかかわらず、各食餌飼育群のHMG-CoA reductase 活性には Table 3 と同様の差異が認められた (Fig. 5)。すなわち、SL—SP食餌飼育群間、およびGL—GP食餌飼育群間において認められる本酵素活性の亢進は食餌中の脂質を不可欠脂肪酸であるリノール酸から非不可欠脂肪酸であるパルミチン酸に置き換えたために生じ、また、SL—GL食餌飼育群間、およびSP—GP食餌飼育群間において認められる本酵素活性の亢進は、食餌中の糖質を澱粉からブドウ糖に置き換えることにより生じたものであることが明らかになった。固型食餌飼育群とSL食餌飼育群との間には本酵素活性の差が認められなかった。

### (3) コレステロール胆石の形成過程における胆汁脂質分泌と HMG-CoA reductase 活性との関係

コレステロール胆石形成に及ぼす HMG-CoA reductase 活性の影響を更に解明するために、GP食餌とGL食餌で飼育中のハムスターを、胆汁脂質分泌測定群と HMG-CoA reductase 活性測定群の2群に分け、飼育後7日毎に測定を行い両者の経時的相関について検討した。なお、コレステロール胆石形成率は両群の成績を合わせて記載した。

#### a) 胆汁脂質分泌の時間的推移

総胆管カニュレーション後、最初の1時間に分泌されたハムスターの肝胆汁についての成績を Table 4 に示す。

その結果、以下の事実が明らかとなった。①胆汁分泌量に関しては、GP食餌、GL食餌および固型食餌飼育群間に差を認めなかった。②胆汁酸分泌量は、GP食餌とGL食餌飼育群との間に、全飼育期間中差はなかったが、両群共に固型食餌飼育群よりも胆汁酸分泌量は減少していた。③リン脂質分泌量には3群の間に差がなかった。④コレステロール分泌量は、GP食餌群で飼育後7日目から分泌量が増加し、14日目には固型食餌飼育群に比べて3.5倍のコレステロールを分泌するようになり、その後も飼育期間と共に分泌量は増加した。⑤肝胆汁の lithogenic index は、固型食餌およ

Cholesterol	Relative concentration of		Lithogenic index
	Bile acids	Phospholipids	
	moles %		
1.93±1.22	95.6±2.42	2.47±1.23	0.37±0.14
1.68±0.35	93.1±1.01	5.23±0.42	0.26±0.08
7.60±2.67 <sup>bc</sup>	88.0±5.33	4.60±3.15	1.14±0.24 <sup>bc</sup>
3.12±0.75 <sup>b</sup>	91.3±3.35	5.50±3.24	0.49±0.11 <sup>b</sup>
6.97±1.38 <sup>bc</sup>	88.6±3.89	6.35±2.95	1.01±0.13 <sup>bc</sup>
1.57±0.26	94.0±3.46	4.45±3.20	0.27±0.04
7.50±1.37 <sup>bc</sup>	84.9±5.02	7.42±3.83	1.07±0.10 <sup>bc</sup>
1.54±0.86	94.4±2.43	4.06±2.02	0.25±0.15
1.11±0.22	95.3±1.95	3.58±2.04	0.17±0.03

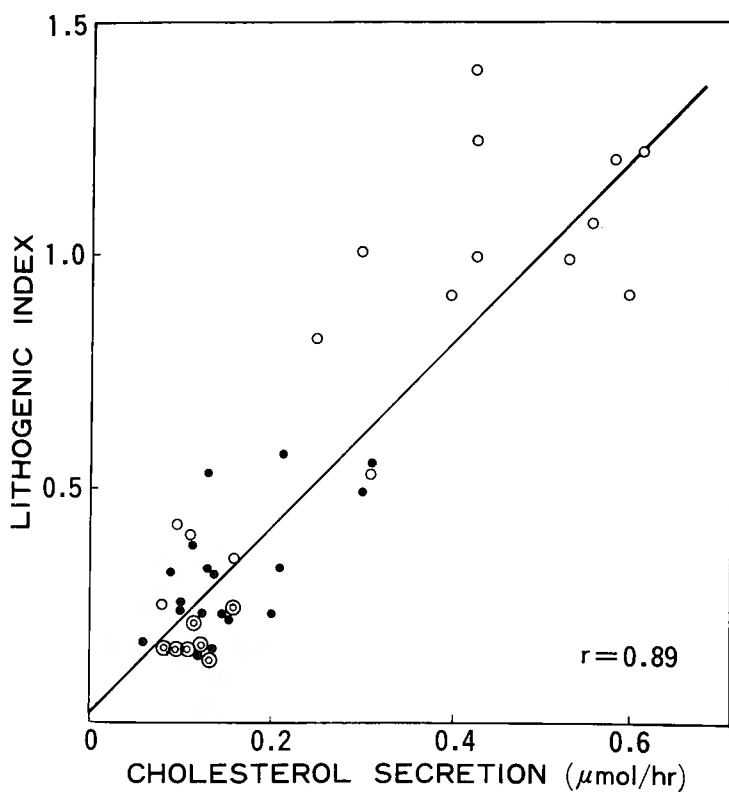


Fig. 6. Relation of cholesterol secretion to lithogenic index. ○, animals fed with GP diet ; ●, animals fed with GL diet; ⊙, animals fed with chow diet. The regression line is fitted by least squares, with gives a correlation coefficient,  $r$ , of 0.89.

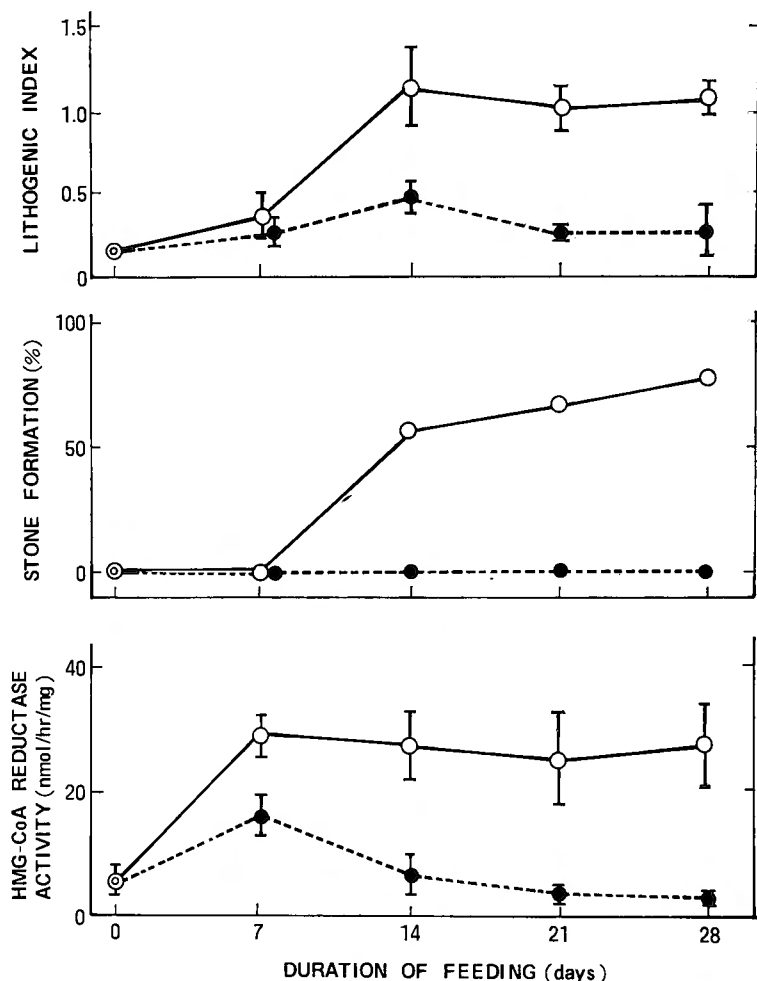


Fig. 7. HMG-CoA reductase activity, lithogenic index and incidence of cholesterol gallstones as a function of duration of GP and GL diet. Each point of HMG-CoA reductase activity is mean  $\pm$  SD of determinations from six animals  $\pm$  SD. Lithogenic index is expressed as mean  $\pm$  SD and incidence of cholesterol gallstones is calculated from the data shown in Table 4. ○, animals fed with GP diet; ●, animals fed with GL diet

びGL食餌飼育群においては全て1.0より小さい値を示したが、GP食餌飼育群では、14日目以降の lithogenic index は1.0以上であり、方法の稿で述べた通りこれらの胆汁はコレステロール過飽和となっていた。⑥上述のGP食餌飼育群における lithogenic index の上昇が胆汁酸分泌量の減少によるものか、コレステロール分泌量の増加によるものかを検討した結果、Fig. 6の様に lithogenic index はコレステロール分泌量と強い正の相関を持っていた。

#### b) コレステロール胆石形成率の時間的推移

GP食餌で飼育を始めて7日目まではコレステロール胆石の形成を認めなかったが、胆汁がコレステロール過飽和となる14日目になると、約50%にコレステロール胆石の形成を認める様になり、28日目にはほぼ80%にその形成を認めた。しかし、前述した様に固型食餌およびGL食餌飼育群では全飼育期間中、その発生を認めなかった。

#### c) HMG-CoA reductase 活性の時間的推移

**Table 5** Incidence of cholesterol gallstones and level of HMG-CoA reductase activity after change of diet<sup>a</sup>

	Diet	Duration (day)	Body Weight (g)	Liver Weight (g)	Incidence of Cholesterol stones	HMG-CoA reductase activity (nmol/hr/mg)
Exp. 1	GP	28	57± 8.4	2.4±0.4	9/11	29.5±12.0
	GP→GL	28	64±10.0	4.2±0.5	5/12	4.8± 2.6 <sup>b</sup>
	GP→Chow	28	69± 4.9	4.4±0.8	3/9	0.7± 0.2 <sup>b</sup>
Exp. 2	GP	28	49± 6.1	3.4±0.5	7/10	33.3±10.4
	GP→GP	56	66± 8.3	4.4±0.6	13/16	26.6±17.3 <sup>b</sup>
	GP→GL	56	64± 9.4	4.2±0.7	0/13	3.1± 2.6 <sup>b</sup>
	GP→SL	56	52± 9.3	3.3±0.4	0/10	3.9± 1.4 <sup>b</sup>
	GP→Chow	56	97± 5.7	4.8±0.7	0/11	0.9± 0.3 <sup>b</sup>

a. Animals were fed with GP diet for 28 days, then the diet was replaced by non-lithogenic diet as are shown by arrows in the table. Data are expressed as mean±SD.

b. Significantly different from animals fed with GP diet for 28 days ( $p<0.05$ ).

HMG-CoA reductase 活性は、GP 食餌で飼育後 7 日目には、未だコレステロール胆石の形成されていない時期であるにもかかわらず、すでに  $28.9 \pm 3.6$  nmol/hr/mg と、コレステロール胆石形成の認められる時期の本酵素活性と同程度の亢進を示しており、その後も亢進状態が続いた。

以上の実験成績をまとめたものが Fig. 7 である。

### ③ コレステロール胆石の溶解と HMG-CoA

#### reductase 活性との相関についての実験成績

実験②の結果から、ハムスターにおけるコレステロール胆石は、ブドウ糖の多量摂取と不可欠脂肪酸の欠乏という 2 つの食餌因子により誘導される HMG-CoA reductase 活性の亢進を介して形成されるものであるとの結論を得た（このことについては、考察の稿において詳述する）。

この結論から推察すれば、一旦形成されたコレステロール胆石は、ハムスターの食餌を上記のコレステロール胆石を形成するに必要な食餌因子を除去した食餌に変えることにより、HMG-CoA reductase 活性の低下を介して溶解させることが可能であるといえる。

そこで、コレステロール胆石を保有するハムスターの食餌を実験②で述べたコレステロール胆石を形成せしめない食餌に変更し、コレステロール胆石保有率と HMG-CoA reductase 活性を測定し、コレステロール胆石の溶解と HMG-CoA reductase 活性との関係について検討した (Table 5)。

#### (1) コレステロール胆石保有率

ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌である GP 食餌で

ハムスターを 28 日間飼育し、70～80% の高い頻度でコレステロール胆石を保有していることを確認した後、これらのハムスターの食餌を GP 食餌から、不可欠脂肪酸であるリノール酸を含む GL 食餌、あるいは固型食餌に変更して更に 28 日間飼育したところ、そのコレステロール胆石保有率は GL 食餌群で 40%、固型食餌群では 30% と低下した (Table 5, Exp. 1)。

また、その食餌を GL 食餌、固型食餌あるいは澱粉・リノール酸食餌である SL 食餌に変更して、さらに長期間 56 日間飼育したところ、三群共にコレステロール胆石はもはや認められなくなった (Table 5, Exp. 2)。

食餌変更をせず、GP 食餌のままその後 56 日間飼育した際には、胆石保有率は 70% と、溶解実験開始時と同じ頻度であった (Table 5, Exp. 2)。

この様に、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏というコレステロール胆石を形成するに必要な 2 つの食餌因子のうちで、不可欠脂肪酸欠乏という因子を除去した食餌に変更することにより (GL 食餌)、また不可欠脂肪酸欠乏という因子の除去に加えてブドウ糖因子を除去した食餌に変更することにより (SL 食餌、固型食餌) コレステロール胆石は溶解することが明らかになった。かつ、GL 食餌と SL 食餌または固型食餌との間におけるコレステロール胆石の溶解力には差がないことも明らかになった。

#### (2) HMG-CoA reductase 活性

GP 食餌で 28 日間飼育したハムスターの HMG-CoA reductase 活性は、実験②で述べた様に Exp. 1 においては  $29.5 \pm 12.0$  nmol/hr/mg、Exp. 2 におい

でも  $33.3 \pm 10.4$  nmol/hr/mg と著しく亢進していた。しかし、食餌を GL 食餌及び固型食餌に変更して 28 日間飼育すると、本酵素活性は、 $4.8 \pm 2.6$ ,  $0.7 \pm 0.2$  nmol/hr/mg と低下し (Table 5, Exp. 1), また GL 食餌, SL 食餌および固型食餌に変更して 56 日間飼育すると、本酵素活性はそれぞれ、 $3.1 \pm 2.6$ ,  $3.9 \pm 1.4$ ,  $0.9 \pm 0.3$  nmol/hr/mg となった (Table 5, Exp. 2)。食餌変更をせず GP 食餌のままその後 56 日間飼育した際には、本酵素活性は  $26.6 \pm 17.3$  nmol/hr/mg と溶解実験開始時の本酵素活性との間に差を認めなかった。

この様にコレステロール胆石の溶解と HMG-CoA reductase 活性との間には、コレステロール胆石の形成時と同様の相関関係が存在し、コレステロール胆石が溶解する GL 食餌, SL 食餌あるいは固型食餌飼育群の本酵素活性は、コレステロール胆石の溶解しない GP 食餌飼育群に比して著しく低下していた。しかも、これらコレステロール胆石を溶解する食餌飼育群における本酵素活性の低下は、食餌変更後 28 日目という未だコレステロール胆石が完全に溶解していない時期に既に認められた。

この際にも食餌因子の本酵素活性に与える影響は、コレステロール胆石の形成時と同じであり、不可欠脂肪酸の添加あるいは、不可欠脂肪酸の添加に加えてブドウ糖を澱粉に置き換えることにより、また、これらを十分に含む固型食餌に変更することにより本酵素活性は著明に低下した。

## 考 察

現在までヒトコレステロール胆石症の形成機序および溶解機序について判明している事実は以下の如くである。

コレステロール胆石症患者の発生頻度は、従来欧米において高く、本邦においては低いとされてきたが、本邦においても、第二次大戦後食餌内容の欧米化（砂糖の如く精製された糖質の摂取量増加、およびバターの如く不可欠脂肪酸含有量の少ない動物性脂肪の摂取量増加）と共に近年コレステロール胆石症が増加してきたこと、また、こうした食餌習慣の一般化していない農村部に比べ、一般化した都市部においてコレステロール胆石症患者の発生頻度が急増しているという事実もわれわれの共同研究<sup>36)</sup>で明らかになった。

コレステロール胆石症患者の HMG-CoA reductase 活性はコレステロール胆石を保有しない患者に比べて

亢進していることも Nicolau<sup>39)</sup>, Salen<sup>45)</sup>らによって報告されている。また、コレステロール胆石症の発生頻度の高いアメリカインディアンにおいては、肝臓からのコレステロール分泌量が増加していることが lithogenic bile の成因になっていることも Grundy<sup>20)</sup>らによって報告されている。

Danzinger<sup>11)</sup> がヒトの 1 次胆汁酸の 1 つであるケノデオキシコール酸を経口投与して、ヒトのコレステロール胆石の溶解に成功して以来、この薬剤の作用機序について検討がなされてきたが現在では本薬剤を投与された患者の HMG-CoA reductase 活性が低下していることから<sup>6)</sup>、本剤のコレステロール胆石溶解機序は本酵素活性の抑制によるコレステロール生合成能の低下によるものと推定されている。

しかしながら、こうしたコレステロール胆石の形成と溶解に関して判明している断片的事実は、対象とした症例に入種、年齢および性の差があり、また食餌因子も正確に調査されたものでなく、その上、判明した事実間の相互の関連性、たとえば HMG-CoA reductase 活性がコレステロール分泌量に及ぼす影響等が証明されておらず、これらの事実のみからでは、コレステロール胆石の形成と溶解の機序を全体的にとらえることはできない。

したがって、コレステロール胆石の形成と溶解の機序を解明するためには、実験条件を単純化し、かつ系統的におのおのの機序について検討する必要がある、このためには動物実験を行なうより他ないと考えられる。

今日まで食餌を投与することにより、コレステロール胆石が形成される実験動物としては、ハムスター<sup>9)</sup> <sup>10)</sup>、リスザル、マウス、ウサギ、イヌ、モルモット prairie dog 等が知られているが<sup>12)37)</sup>、この中でハムスターは、その胆汁脂質構成比<sup>3)54)</sup>をはじめ、胆汁酸組成もヒトの胆汁に似ており<sup>42)54)</sup>、形成される胆石もその肉眼的所見、走査電子顕微鏡による微細構造において、ヒトのコレステロール胆石に酷似している<sup>53)</sup>。しかも、リスザルやマウス、prairie dog においては、糖質や脂質の投与に加えてコレステロールの添加が必要であるのに比べ<sup>12)37)</sup>、ハムスターではこうした外因性のコレステロールを負荷することなくコレステロール胆石が形成される<sup>9)10)37)</sup>。また、その腸管内細菌叢もヒトに似ており<sup>49)</sup>、こうしたヒト胆石症に類似した実験モデルを利用してコレステロール胆石の形成および溶解の機序について究明することは、ヒト胆

素症の予防ないしは治療に関して重要な知見を与えるものと考えられる。

### (1) HMG-CoA reductase 活性測定に関する問題

現在 HMG-CoA reductase 活性の変動は、酵素蛋白の生合成量により決められるとされている<sup>13)29)40)</sup>。

予備実験において各食餌飼育群より得られたハムスターの肝ミクロゾーム HMG-CoA reductase 活性の変動が、こうした酵素の量的変動によるものか、あるいは酵素の性格の差によるものかを検討するため至適 pH と Km 値を測定した結果、至適 pH に関しては各食餌飼育群共に pH 7.4 付近にあり近似していたが、(Fig. 3) Km 値は不可欠脂肪酸欠乏食餌群である GP 食餌、SP 食餌飼育群では、不可欠脂肪酸含有食餌群である GL 食餌あるいは固型食餌飼育群に比べて高いことが判明した (Fig. 4)。しかし、測定に用いた酵素がミクロゾームというクルドな状態であるので、この Km 値の違いが酵素間の性質の違いに由来するものであるとは断定できず、したがって各食餌飼育群間において認められる本酵素活性の変動が上記のいずれによるものであるかは断定できない。

ついで過令の差が本酵素活性に与える影響について検討したところ、固型食餌飼育群においては、過令の小さいハムスターの HMG-CoA reductase 活性は、過令のすすんだハムスターのそれに比べて約 7 倍高かった。ハムスターにおいては、発育過程に伴う HMG-CoA reductase 活性の変動は報告されていないが、ラットにおいては離乳直後から本酵素活性の低下が認められており<sup>40)</sup>、本実験結果もこうした発育に伴う現象であるのかもしれない。

また、この様に幼若なハムスター程本酵素活性が高かったという事実は、後に述べる本酵素活性の亢進によりコレステロール胆石が形成されるという実験結果と併せ考えると興味深い。すなわち、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌で飼育した際に、幼若なハムスター程コレステロール胆石の形成頻度が高いのは<sup>51)</sup>、幼若なハムスターの HMG-CoA reductase 活性が老令のものに比べて高いことに由来しているのかもしれない。

HMG-CoA reductase 活性には日内変動のあることが、ラット、マウスにおいて知られており<sup>13)29)40)</sup> ad libitum な食餌摂取条件下では、真夜中の本酵素活性は、真昼に比べて 5—10 倍高いと報告されており、こうした酵素活性の変動は主に、摂食により誘導されるものとされている<sup>40)</sup>。

本実験のように ad libitum な食餌投与スケジュールにおけるハムスターの本酵素活性の日内変動の概略を知るために行った実験結果では、たしかに固型食餌飼育群においては真夜中の酵素活性は真昼の活性に比べ 1.5 倍高かった (Table 2)。この差は既にラットにおいて報告されている 5—10 倍という差に比べて小さいのであるが、著者の行った別の実験結果から (unpublished data)、著者の選んだ時間が本酵素活性の最高値と最低値を示す時間であることはほぼ間違いなく、上記の真夜中と真昼との酵素活性の差が小さいことはハムスターの日内変動がラットに比べて小さいことによるものといえよう。

したがって、合成食餌飼育群において真夜中と真昼の活性との間に差がなかったことは、個体差が本来の変動巾を上まわる程大きいことによるものと考えられる。

### (2) コレステロール胆石の形成機序

各種食餌で 28 日間飼育したハムスターの HMG-CoA reductase 活性とコレステロール胆石の形成率とを同時に検討した結果、コレステロール胆石を形成するハムスターの HMG-CoA reductase 活性は、コレステロール胆石を形成しないハムスターに比べてはるかに亢進していることが判明した (Table 3)。すなわち HMG-CoA reductase 活性は肝臓におけるコレステロールの生合成能を示している<sup>40)</sup>、本酵素活性の亢進しているコレステロール胆石を形成するハムスターの肝臓においては、コレステロール胆石を形成しないハムスターの肝臓に比べ過剰のコレステロールが生成されていると考えてよい。

Jensen<sup>28)</sup>らは、ハムスターの腹腔内に<sup>14</sup>C-酢酸を注射し、<sup>14</sup>C-コレステロールへの合成能を検討して、コレステロール胆石形成食餌飼育群では、その合成能が亢進していることを報告している。また、著者の研究グループの Muroya<sup>34)35)</sup>は、ハムスターの肝臓スライスをを用いて<sup>14</sup>C-酢酸から<sup>14</sup>C-コレステロールへの合成能を検討して、コレステロール胆石形成食餌であるブドウ糖・無脂肪食餌飼育群では、コレステロール胆石を形成しない澱粉・無脂肪食餌飼育群、あるいは、ブドウ糖・リノール酸添加食餌飼育群に比べて、その合成能が亢進していたが、<sup>14</sup>C-メバロン酸を基質とした時には、コレステロールへの合成能には各食餌飼育群間に差がなかったことより、コレステロール胆石形成食餌飼育群におけるコレステロール合成能の亢進はメバロン酸より前の段階において律速されていることを

指摘し、その律速部位は HMG-CoA reductase にあるものと示唆している。しかし、直接に肝臓の HMG-CoA reductase 活性を測定したのではなく、また、彼らの用いた食餌はブドウ糖・無脂肪食餌であり、著者と同じくハムスターを不可欠脂肪酸欠乏状態にするとはいえ、無脂肪という非生理学的な食餌であり、ヒト胆石症においても無脂肪という食餌条件はありえない。

このようにして、肝臓において過剰に生成されたコレステロールの代謝経路としては、以下の4つの主要な経路が知られている。1. コレステロールの形で肝臓中に蓄積される。2. コレステロールの形で血中に放出される。3. コレステロールの形で肝臓から胆汁中へ分泌される。4. 胆汁酸に異化されて肝臓から胆汁中へ分泌される。

コレステロール胆石を形成するハムスターにおいては、肝臓中での総コレステロール蓄積がないこと、また、血中総コレステロール量の上昇もないことは、Muroya<sup>34)35)</sup>、Robins<sup>44)</sup>、Ginsberg<sup>17)</sup> らによって既に報告されているので、今回は、コレステロール胆石形成食餌飼育群での肝臓中における総コレステロール量の増加のないことを確認したにとどめた。したがって、こうした食餌因子による HMG-CoA reductase 活性の亢進を介して過剰に生成されたコレステロールは、コレステロールのまま、あるいはコレステロールから異化されて胆汁酸として胆汁に分泌されるものと考えられる。コレステロールから胆汁酸への異化を律速しているのは cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase であるといわれており、cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性が低下していれば、当然コレステロールの胆汁酸への異化が阻害され、胆汁酸分泌量が減少することとあいまって、lithogenic bile の形成を更に促進するものと考えられる。

しかし著者の実験結果ではコレステロール胆石を形成するハムスターの胆汁酸分泌量はコレステロール胆石を形成しないハムスターのそれと有意の差がなく、このことから考えると cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性の抑制があるとは考えにくい。

HMG-CoA reductase 活性と cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性と同時測定を主張する Shoenfield らのグループ<sup>41)47)</sup>は、最近ハムスターに経口避妊薬であるエストラディオールとともにコレステロールを負荷した際に90%の高率にコレステロール胆石の形成されることを見出した。しかし、彼らの成績では、コントロールに比べかえって HMG-CoA reductase 活性は抑制

され、cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性には変化が認められていない。ハムスターを用いて著者と同じく高率にコレステロール胆石を形成するモデルでありながら、HMG-CoA reductase 活性の変動が全く著者の実験結果と反対である理由は不明である。

次に、胆汁脂質分析結果からみた lithogenic bile の成因について考察すると、コレステロール胆石を形成するハムスターの胆汁は、諸家の報告と同様、著者の測定結果でもたしかにコレステロール過飽和であった。コレステロール胆石を形成するハムスターにおける肝臓からのコレステロール、胆汁酸およびリン脂質の分泌量を、コレステロール胆石を形成しないハムスターのそれと比べると、コレステロール分泌量のみが著明に増加しており、胆汁酸とリン脂質分泌量には差がなかった (Table 4)。

また、胆汁のコレステロール飽和度を示す Metzler による lithogenic index は、コレステロール分泌量と強い正の相関を示したので (Fig. 6)、コレステロール胆石を形成するハムスターの lithogenic bile の成因は、胆汁酸分泌量の減少によるものではなく、コレステロール分泌量の増加によるものであるといえる。

そして、この胆汁中に過剰に分泌されたコレステロールの材料は、著者の実験結果からすれば、上述のコレステロール胆石を形成するハムスターの HMG-CoA reductase 活性の亢進により肝臓において過剰に生成されたコレステロールであると推定される。このことは、HMG-CoA reductase 活性と胆汁の lithogenic index およびコレステロール胆石形成率を GP 食餌投与後、経時的に検討した結果 (Fig. 7) により、更に確認できた。すなわち HMG-CoA reductase 活性は、コレステロール胆石の形成される以前、もちろん胆汁がコレステロール過飽和になる前にすでに亢進しており、HMG-CoA reductase 活性の亢進したことにより、肝臓で過剰に生成されたコレステロールが胆汁中に分泌されたと結論できよう。

### (3) 食餌因子が HMG-CoA reductase 活性に及ぼす影響

合成食餌である澱粉・リノール酸食餌である SL 食餌飼育群における本酵素活性が固型食餌飼育群と変わらなかったことから、観察された合成食餌飼育群における本酵素活性の亢進は、固型食餌に含まれていると思われる約0.01%のコレステロールや、その他合成食餌に含まれない食餌因子が欠如した為におこったものと

は考えられないし、各種食餌で飼育したハムスターにおける食餌摂取量には差がなかったので、観察された合成食餌飼育群間における本酵素活性の差異は各食餌群間における食餌組成の差によりもたらされたものと考えてよい (Fig. 5).

すなわち、食餌中の糖質を澱粉からブドウ糖に換えることにより、また、脂質をリノール酸からパルミチン酸に換え不可欠脂肪酸を食餌中から除去することにより、本酵素活性は亢進するのである。

Lakshmanan<sup>31)38)</sup>らは、ラットにインシュリンを注射することにより HMG-CoA reductase 活性が亢進することを報告している。Crapo<sup>8)</sup>はヒトにおいて経口的に種々の糖質を投与した後の血中インシュリン量は、投与した糖質分子の小さい程増加することを認めており、食餌中のブドウ糖が澱粉に比べ本酵素活性を亢進させるのは、ブドウ糖が澱粉に比べて血中インシュリン量を増加させることによるものかもしれない。

Faas<sup>15)</sup>はラットの肝ミクロゾームを用いて *in vitro* で多不飽和脂肪酸アシル CoA チオエステルであるアラキドンイル CoA やリノレオイル CoA は、HMG-CoA reductase 活性を強く抑制するが、飽和脂肪酸チオエステルであるパルミトイル CoA や、ステアロイル CoA ではその効果が弱いことを認めている。また Eguchi<sup>14)</sup>は、ブドウ糖・無脂肪食餌で飼育したハムスターの肝臓中のアラキドン酸とリノール酸量は減少していることを認めている。食餌中の不可欠脂肪酸欠乏が本酵素活性を亢進させるのは、不可欠脂肪酸の欠乏により肝細胞内での多不飽和脂肪酸アシル CoA チオエステル濃度が低下し、その結果本酵素活性の抑制が解除されることによっているのかもしれない。とはいえ、食餌中のブドウ糖が澱粉に比べて本酵素活性を亢進させる機序、および不可欠脂肪酸の欠乏が本酵素活性を亢進させる機序についての詳細は今後の問題であろう。

一方、Tanimura<sup>50)</sup>によれば、ハムスターにおいては、食餌中に含まれる糖質分子が小さい程、かつまた、不可欠脂肪酸含有量が少ない程、コレステロール胆石の形成率は高いといい、これらの実験成績は、食餌中の糖質分子の大きさおよび不可欠脂肪酸含有量が HMG-CoA reductase 活性の変動を介してコレステロール胆石形成に影響を与えているとする著者の推論を裏づけるものと考えられる。

この様な、食餌中の糖質と脂質の種類の差が HMG-CoA reductase 活性に及ぼす影響は、試験としてハム

スターを用いた際の報告によく一致しているが<sup>17)26)</sup>、っており<sup>7)</sup>でラットを用いた際の報告とはかなり異なる試験とし<sup>19)25)43)</sup>動物の種差によるものと考えられ、胆石症の研究における実験動物の選択は極めて重要な条件であるといえる。また、本実験における食餌中のブドウ糖と澱粉の差およびパルミチン酸とリノール酸の差が HMG-CoA reductase 活性に及ぼす影響は、前述の Muroya<sup>34)35)</sup>によるハムスターの肝臓におけるコレステロール生合成に及ぼす影響とほぼ同様であり、ハムスターにおいても本酵素がコレステロール生合成を律速していることは、ほぼ間違いない事実と思われる。

ここで食餌因子がコレステロール胆石形成におよぼす影響と、食餌因子が HMG-CoA reductase 活性におよぼす影響とをあわせて考察すると、食餌因子による HMG-CoA reductase 活性の変動を介して、コレステロール胆石が形成されていることが明瞭となる。

コレステロール胆石を形成するのに必要な因子であるブドウ糖因子と不可欠脂肪酸欠乏因子はおのこの独自に HMG-CoA reductase 活性を亢進させるのであるが、1つの食餌因子のみによってはコレステロール胆石は形成されない。この理由は、1つの食餌因子のみによる本酵素活性の亢進によっては、胆汁をコレステロール過飽和にするに必要なコレステロールが肝臓において生成されないためであり、二つの食餌因子が共存する時にもたらされる本酵素活性亢進の相和により、はじめて胆汁がコレステロール過飽和になるだけのコレステロールが肝臓において生成されるものと考えられる。

これらの事実から著者はコレステロール胆石は以下の機序により形成されるものと考える。

ブドウ糖の多量摂取に加えて不可欠脂肪酸の摂取欠乏により HMG-CoA reductase 活性が亢進し、肝臓におけるコレステロールの生合成が亢進する。この結果、肝臓において過剰のコレステロールが生成され、過剰のコレステロールが胆汁に分泌されることになり、胆汁がコレステロール過飽和になりコレステロールの析出がおこりコレステロール胆石が形成される。

#### (4) コレステロール胆石の溶解機序

現在の胆汁膠質学<sup>1)24)</sup>によると、胆汁脂質による混合ミセルのコレステロール溶存能を超えたコレステロールが胆汁中に存在する時に、胆汁中でコレステロールが析出し、コレステロール胆石が形成されるので、コレステロール胆石の溶解は究極的には胆汁のコレステロール溶存能を高めることにあるといつてよい。



以上述べた様な食餌因子による HMG-CoA reductase 活性の亢進がコレステロール胆石形成の原因であるとする著者の実験結果からすると、ハムスターにおける食餌因子により形成されたコレステロール胆石を溶解させるためには、コレステロール胆石を保有するハムスターの亢進した HMG-CoA reductase 活性を低下させることこそ最も重要な key point と考えられる。

著者は、一旦亢進した HMG-CoA reductase 活性を低下させる条件を、食餌因子の中に求め、HMG-CoA reductase 活性を亢進させる食餌因子を食餌から除去することにより HMG-CoA reductase 活性を低下させ得れば、それに引き続くコレステロール胆石形成時とは全く反対の機序をたどって、コレステロール胆石の生体中における溶解がおこりうるものと考えた。

そこで、ハムスターをブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌である GP 食餌で28日間飼育して、コレステロール胆石をその胆のう内に形成せしめた後、その食餌を不可欠脂肪酸欠乏因子を除去した GL 食餌、あるいは、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏因子の両方を除去した SL 食餌および固型食餌に変更して飼育したところ、食餌変更前には約80%の高頻度で存在したコレステロール胆石は、28日後には半減し、56日後には完全に認められなくなった。一方、食餌変更前には著しく亢進していた HMG-CoA reductase 活性は、いずれの食餌飼育群においても、変更後28日目には、食餌変更前に比べ著しく低下していた (Table 5)。

HMG-CoA reductase 活性がコレステロール胆石の完全に溶解する以前にすでに低下していたという以上の事実、コレステロール胆石の溶解が HMG-CoA reductase 活性の低下に始まるとする著者の指摘が正しかったことを証明するものである。

また、コレステロール胆石の形成時と同様に、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏という二つの食餌因子のうちの不可欠脂肪酸欠乏という因子を除去した食餌 (GL 食餌) と両方の因子を除去した食餌 (SL 食餌、固型食餌) との間にはコレステロール胆石の溶解作用に差がなかったことは、コレステロール胆石の溶解には必ずしもブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏という二つの因子を食餌から除去する必要はなく片方の因子のみを除去することによっても、その溶解が可能であることを意味しており、今回試みなかったブドウ糖因子を除去した食餌 (SP 食餌) においても、上記と同様の溶解

作用があるものと考えられる。

食餌変更後におけるこうした食餌因子が HMG-CoA reductase 活性におよぼす影響は、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌である GP 食餌により亢進した HMG-CoA reductase 活性が不可欠脂肪酸の添加により (GL 食餌) 抑制され、また、不可欠脂肪酸の添加に加えて、ブドウ糖を澱粉に置き換えることによって (SL 食餌、固型食餌) さらに強く抑制されたことから考えて、可逆的なものであるといえる。

また、コレステロール胆石の形成には28日を要するのに比べて、その溶解には56日を要するという事実は、結晶の溶解に要する時間は結晶の析出に要する時間より長いかかるという膠質学的見地から考えて当然であろう。

ごく最近 Kritchevsky<sup>30)</sup>らは、HMG-CoA reductase 活性を抑制するために、本酵素の阻害剤であるヒドロキシメチルグルタル酸をハムスターの食餌に混入することにより、一旦形成されたコレステロール胆石が溶解したと報告しているが、彼らは HMG-CoA reductase 活性を測定していないので、ヒドロキシメチルグルタル酸が in vivo で HMG-CoA reductase 活性を抑制したか否かは不明である。

以上の事実から著者はコレステロール胆石の溶解機序を以下のように考える。すなわち、コレステロール胆石を形成するのに必要なブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏という二つの食餌因子のうちから、いずれか一方ないしは両方を食餌から除去することにより、亢進していた HMG-CoA reductase 活性が低下し、肝臓における亢進していたコレステロール生合成能が低下し、胆汁へのコレステロール分泌量が減少する結果、胆汁のコレステロール溶存能が高まり、コレステロール胆石の溶解に至るという、コレステロール胆石の形成時とは全く反対の機序をたどってコレステロール胆石が溶解するものと考えられる。

以上、既述したヒトとハムスターの解剖学上および生理学上の類似点に加えて、著者がハムスターを用いて得たコレステロール胆石の形成と溶解機序に関する知見は、1. コレステロール胆石を形成するに必要な食餌因子、2. コレステロール胆石形成時の HMG-CoA reductase 活性の変動 3. コレステロール胆石形成時の lithogenic bile の形成機序 4. コレステロール胆石溶解時の HMG-CoA reductase 活性の変動の点において、考察の稿で冒頭に記述したヒトのコレステロール胆石症に関して現在までに判明している事

実と合致するので、著者が推察したコレステロール胆石の形成と溶解の機序は、ヒトのコレステロール胆石症にもあてはまるものと考えられる。

そこで臨床においても、ブドウ糖や砂糖の如く単糖、二糖類などの（乳糖は除く）糖質の多量摂取や、不可欠脂肪酸含有量の少ない脂質（例えば動物性脂肪）の摂取といったコレステロール胆石を形成せしめる食餌因子を、日常の食餌内容から可及的に除去するという栄養学的指導こそ、コレステロール胆石症を予防するのみならず、ケノデオキシコール酸療法に付随する、副作用や長期服用の必要性および投与中止時における再発等の問題点を克服するコレステロール胆石に対する有効な治療法であると考えられる。

## 結 語

ハムスターを種々の食餌条件下で飼育し、肝臓におけるコレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性を測定し、本酵素活性とコレステロール胆石の形成と溶解との関係について特に食餌中の糖質、および脂質との関連において検討し、以下の結論を得た。

(1) ブドウ糖・パルミチン酸食餌でハムスターを飼育すると、高率にコレステロール胆石の形成を認められたが、糖質として澱粉を用いると、胆石の形成は認められなかった。糖質としてブドウ糖を用いた際にも、脂質として不可欠脂肪酸であるリノール酸を併せ投与した際には、胆石の形成は認められなかった。

(2) 前項と同じ食餌条件下で、HMG-CoA reductase 活性を測定すると、ブドウ糖・パルミチン酸食餌飼育群では、澱粉・パルミチン酸食餌飼育群の2倍、ブドウ糖・リノール酸食餌飼育群の6倍と、その酵素活性が亢進していた。この様に、HMG-CoA reductase 活性とコレステロール胆石形成との間には密接な相関関係があり、コレステロール胆石を形成する食餌条件下では、HMG-CoA reductase 活性の亢進が認められた。

(3) ブドウ糖・パルミチン酸食餌で飼育すると、肝胆汁は14日目にはコレステロール過飽和になり、その後も過飽和状態が持続した。肝胆汁がコレステロール過飽和になる要因は肝臓のコレステロール分泌量が増加することによるものであることも判明した。一方、HMG-CoA reductase 活性は、胆汁がコレステロール過飽和になるよりはるかに早い時期から、既に亢進していた。

これらの事実からコレステロール胆石は、ブドウ糖・不可欠脂肪酸欠乏食餌投与により、HMG-CoA reductase 活性が亢進するため、肝臓においてコレステロール生合成の亢進がおこり、胆汁へのコレステロール分泌が増加する結果、胆汁がコレステロール過飽和になり、形成されるものと考えてよい。

(4) そこでブドウ糖・パルミチン酸食餌で飼育して、一旦コレステロール胆石を形成せしめたハムスターの食餌を、ブドウ糖・リノール酸食餌、または澱粉・リノール酸食餌、または固型食餌に換えて飼育したところ、いずれの食餌飼育群でも食餌変更後28日目には、胆石保有率は半減し、56日目には全く胆石を認めなくなった。しかし、食餌変更をせずブドウ糖・パルミチン酸食餌のまま56日飼育した際には、胆石保有率は変化しなかった。

(5) 前項と同じ食餌条件下で HMG-CoA reductase 活性を測定すると、食餌変更をせずブドウ糖・パルミチン酸食餌のまま飼育した群においては、食餌変更前に比べて本酵素活性は、変化していなかったが、食餌変更をした群においてはいずれも28日目、56日目に共に著明に低下していた。

以上の実験結果から、コレステロール胆石を保有するハムスターの食餌を、コレステロール胆石を形成せしめない食餌に変更することによって、コレステロール胆石が溶解すること、および亢進していた HMG-CoA reductase 活性が、コレステロール胆石の溶解するより早い時期に低下することが明らかになった。したがってコレステロール胆石の溶解は、食餌中からブドウ糖や不可欠脂肪酸欠乏といったコレステロール胆石を形成せしめる食餌因子を除去することにより HMG-CoA reductase 活性を低下せしめれば、コレステロール胆石形成時とは全く反対の機序で胆汁組成が正常化することによるものであることを実験的に明らかにした。

本論文の要旨は、第65回日本消化器病学会総会（東京、1979）及び第21回日本消化器病学会秋季大会（前橋、1979）及び第66回日本消化器病学会総会（東京、1980）において発表した。

稿を終るにあたり、ご指導と御校閲を頂いた外科学教室第2講座日笠頼則教授、御指導頂いた谷村 弘講師に深く感謝いたします。又、御指導戴くと共に実験施設を御提供下さった医学部病態学教室村地 孝教授に感謝の意を表します。

本研究の一部は文部省科学研究補助金 No. 244050 によるものである。

## 文 献

- 1) Admirand WH and Small DM : The physico-chemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* **47** : 1043-1052, 1968.
- 2) Allain CC, et al : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20** : 470-475, 1974.
- 3) Beher WT, Casazza KK, et al : Effect of accumulated tissue cholesterol on bile acid metabolism in hypophysectomized rats and hamsters. *Atherosclerosis* **12** : 383-392, 1970.
- 4) Bray GA : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal Biochem* **1** : 279-285, 1960.
- 5) Carey MC and Small DM : The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am J Med* **49** : 590-608, 1970.
- 6) Coyne MJ, Goldstein LI, et al : Effect of chenodeoxycholic acid and phenobarbital on the late-limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in patient with gallstones. *J Lab Clin Med* **87** : 281-291, 1976.
- 7) Craig MC, Dugan RE, et al : Comparative effects of dietary regimens on the level of enzymes regulating the synthesis of fatty acids and cholesterol in rat liver. *Arch Biochem Biophys* **151** : 128-136, 1972.
- 8) Crapo PA, Reaven G, et al : Plasma glucose and insulin responses to orally administered simple and complex carbohydrates. *Diabetes* **25** : 741-747, 1976.
- 9) Dam H and Christensen F : Alimentary production of gallstones in hamsters. *Acta Path Microbiol Scand* **30** : 236-242, 1952.
- 10) Dam H and Christensen F : Alimentary production of gallstones in hamsters. 9. Influence of different carbohydrate sources on gallstone formation, diarrhea and growth. *Z Ernährungswiss* **2** : 91-102, 1961.
- 11) Danzinger RG, Hofmann AF, et al : Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *New Eng J Med* **286** : 1-8, 1972.
- 12) DenBesten L, Safaie-Shirazi S, et al : Early changes in bile composition and gallstone formation induced by a high cholesterol diet in prairie dogs. *Gastroenterology* **66** : 1036-1045, 1974.
- 13) Edwards PA, Gould RG : Turnover rate of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase as determined by use of cyclohexamide. *J Biol Chem* **247** : 1520-1524, 1972.
- 14) Eguchi T : Studies on pathogenesis of cholesterol gallstones, especially with respect to behavior of cholesterol metabolism. *Arch Jap Chir* **34** : 1181-1196, 1965.
- 15) Faas FH, Carter WJ, et al : Fatty acyl-CoA inhibition of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA reductase activity. *Biochim Biophys Acta* **531** : 158-166, 1978.
- 16) Fausa O : Quantitative determination of serum bile acids using a purified 3- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Scand J Gastroenterology* **10** : 747-752, 1975.
- 17) Ginsberg RL, Daune WC, et al : Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in hamsters on a lithogenic diet. *J Lab Clin Med* **89** : 928-936, 1977.
- 18) Goldfarb S and Pitot HC : Improved assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res* **12** : 512-515, 1971.
- 19) Goldfarb S and Pitot HC : Stimulatory effect of dietary lipid and cholestyramine on hepatic HMG CoA reductase. *J Lipid Res* **13** : 797-801, 1972.
- 20) Grundy SM, Metzger AL, et al : Mechanisms of lithogenic bile formation in American Indian women with cholesterol gallstones. *J Clin Invest* **51** : 3026-3043, 1972.
- 21) Hikasa Y, Matsuda S, et al : Initiating factors of gallstones, especially cholesterol stones (III). *Arch Jap Chir* **38** : 107-124, 1969.
- 22) Ho KJ : Circadian rhythm of cholesterol biosynthesis: Dietary regulation in the liver and small intestine of hamsters. *Intern J Chronol* **6** : 39-50, 1979.
- 23) Hoeflmayr J, et al : Eine methode zur routinemässigen bestimmung des lipidphosphorus und der phosphatide. *Med und Ern* **7** : 9-10, 1966.
- 24) Holzbach RT, Marsh M, et al : Cholesterol solubility in bile: Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* **52** : 1467-1479, 1973.
- 25) Ide T, Okamatsu H, et al : Regulation by dietary fats of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase in rat liver. *J Nutr* **108** : 601-612, 1978.
- 26) Iijima Y, Yamazaki M, et al : Effects of dietary fatty acids on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in hamsters on a high-glucose diet. *Arch Biochem Biophys* **196** : 265-269, 1979.
- 27) Isaksson B : On the dissolving power of lecithin and bile salts for cholesterol in human bladder bile. *Acta Soc Med Upsal* **59** : 296-306, 1954.

- 28) Jensen B and Dam H : Cholesterol metabolism in hamsters reared on diets with different effects on gallstone formation. *Biochim Biophys Acta* **125** : 367-374, 1966.
- 29) Kandutsch AA and Saucier SE : Prevention of cyclic and Triton-induced increases in hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. *J Biol Chem* **244** : 2299-2305, 1969.
- 30) Kritchevsky D, Story JA, et al : Dissolution of gallstones in hamsters by 3-hydroxy-3-methylglutaric acid. *Experimentia* **34** : 1328, 1978.
- 31) Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, et al : Stimulation by insulin of rat liver  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol-synthesizing activities. *Biochem Biophys Res Comm* **50** : 704-710, 1973.
- 32) Lowry OH, Rosebrough NJ, et al : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275, 1951.
- 33) Metzger AL, Heymsfield SH, et al : The lithogenic index—a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology* **62** : 499-501, 1972.
- 34) Muroya H : Stimulative effect of dietary glucose on hepatic cholesterol biosynthesis and formation of cholesterol gallstones in hamsters. *Arch Jap Chir* **37** : 76-93, 1968.
- 35) Muroya H, Suzue R, et al, : Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by dietary glucose, and its relation to cholesterol gallstone formation in the hamster. *Arch Biochem Biophys* **124** : 12-17, 1968.
- 36) 長瀬正夫, 谷村弘他 : 胆石手術 2,244 例の集計結果 (第 3 報) —殊に胆石の種類を中心として. —*日外宝* **46** : 740-747, 1977.
- 37) Nair PP and Kritchevsky D : *The Bile Acids. Vol II : Physiology and Metabolism.* New York London, Prentice Hall, 1973.
- 38) Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, et al : Regulation of the diurnal rhythm of rat liver  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase activity by insulin, glucagon, cyclic AMP and hydrocortisone. *Arch Biochem Biophys* **160** : 387-393, 1974.
- 39) Nicolau G, Shefer S, et al : Determination of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *J Lipid Res* **15** : 94-98, 1974.
- 40) Paoletti R and Kritchevsky D : *Advances in Lipid Research. Vol 14 : Regulation of HMG-CoA reductase.* New York, Academic Press, 1976.
- 41) Pearlman BJ, Bonorris GG, et al : Cholesterol gallstone formation and prevention by chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Gastroenterology* **77** : 634-641, 1979.
- 42) Redinger RN and Small DM : Bile composition, bile salt metabolism and gallstones. *Arch Intern Med* **130** : 618-630, 1972.
- 43) Reiser R, Henderson GR : Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase of rats fed semipurified and stock diets. *J Nutr* **107** : 453-457, 1977.
- 44) Robins SJ and Fasulo J : Mechanism of lithogenic bile production: Studies in the hamster fed an essential fatty acid-deficient diet. *Gastroenterology* **65** : 104-114, 1973.
- 45) Salen G, Nicolau G, et al : Hepatic cholesterol metabolism in patients with gallstones. *Gastroenterology* **69** : 676-684, 1975.
- 46) Shapiro DJ and Rodwell VW : Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J Biol Chem* **246** : 3210-3216, 1971.
- 47) Shoenfield LJ, Bonorris GG, et al : Induced alterations in the rate-limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the hamster. *J Lab Clin Med* **82** : 858-868, 1973.
- 48) Small DM and Rapo S : Source of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. *New Eng J Med* **283** : 53-57, 1970.
- 49) 田島嘉雄 : 実験動物学, 各論. 朝倉書店, 東京, 1972.
- 50) Tanimura H : Experimental studies on the etiology of cholelithiasis. *Arch Jap Chir* **34** : 1160-1180, 1965.
- 51) 谷村弘, 日笠頼則 : 胆石症—コレステロール結石—. *日本臨床* **30** : 234-241, 1972.
- 52) 谷村 弘, 塩田隆三他 : 胆石症—とりわけコレステロール系胆石の成因. *日本臨床* **31** : 2085-2094, 1973.
- 53) Tanimura H, Shioda R, et al. : Initiating factors in formation of cholesterol gallstones. *Arch Jap Chir* **47** : 427-445, 1978.
- 54) 内田清久, 門脇真澄 : 胆汁と胆汁酸の比較生化学. *代謝* **145** : 増刊号 199-210, 1977.
- 55) Vlahcevic ZR, Bell CC, et al : Significance of the liver in the production of lithogenic bile in man. *Gastroenterology* **59** : 62-69, 1970.